Estudio de Cross-Match por Citometría en el Transplante

M. Emilia Bianco
Lic en Bioquimica
Centro de Referencia Provincial de Histocompatibilidad
CUCAIBA

Introducción

- La detección de estos anticuerpos (Acs) potencialmente dañinos, fijadores de complemento, se ha llevado a cabo desde hace 40 años por la técnica de CDC.

- Actualmente se utiliza la técnica de CDC en combinación con la de Citometría de Flujo (CF) **MAYOR SENSIBILIDAD**

Crossmatch

- Es una técnica que se emplea para evaluar la presencia de anticuerpos en el suero del receptor contra antígenos presentes en linfocitos del donante.

- Es un estudio fundamental en la evaluación inmunológica de los pacientes candidatos a trasplante renal.

Anticuerpos anti-HLA

- La formación de anticuerpos se da por eventos de exposición previa al HLA (eventos de sensibilización) como:
  - Transfusiones
  - Embarazos
  - Trasplantes previos
- La existencia de anticuerpos preformados en el suero del receptor puede dar lugar a la una respuesta inmune inmediata contra el injerto (rechazo hiperagudo).

Tipos de Crossmatch

- Crossmatch contra panel o PRA (Panel Reactive Antibodies).
- Crossmatch contra donante.

Crossmatch contra Panel

- Estudia la presencia de anticuerpos reactivos en el suero de un receptor contra un panel de antígenos seleccionados HLA que representan la población general.
- Su resultado se expresa en % y representa la probabilidad de pruebas positivas contra potenciales donantes.

Crossmatch contra Panel

- Existen distintas técnicas disponibles para evaluar el crossmatch contra panel
- CDC (Citotoxicidad mediada por complemento)
- ELISA
- Citometría de Flujo: Flow PRA
- Luminex

Crossmatch contra donante

- En este caso se analiza la presencia de anticuerpos específicos contra un donante.

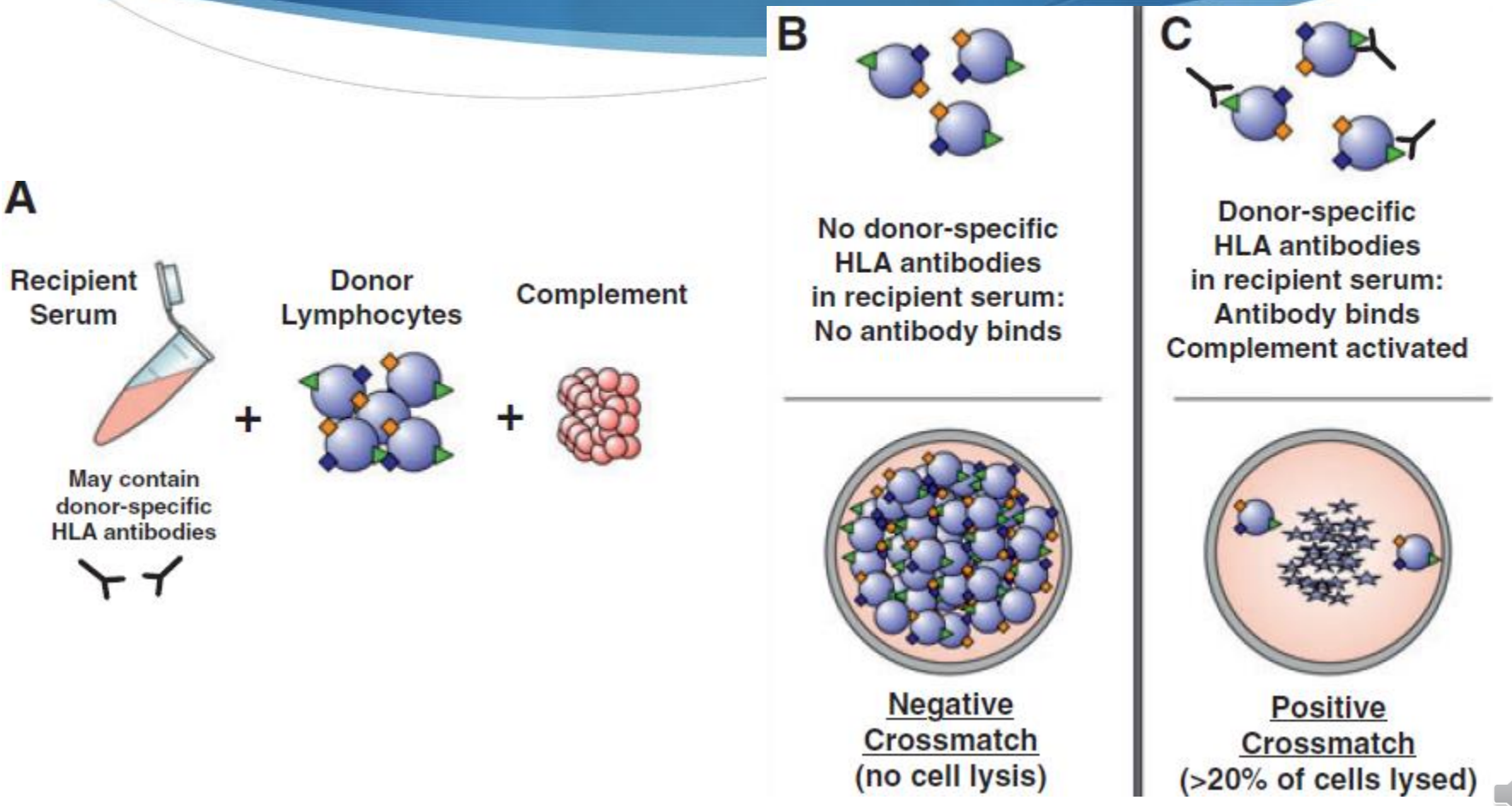
- El estudio de la pareja donante-receptor permite cuantificar y minimizar el rechazo del implante a corto y largo plazo.

Crossmatch contra donante

Cuándo se realiza un crossmatch contra donante?

- Previo al Tx renal con donante cadavérico
- Previo al Tx renal con donante vivo relacionado

Crossmatch contra donante: CDC


A
Recipient Serum
Donor Lymphocytes
Complement
May contain donor-specific HLA antibodies
B
No donor-specific HLA antibodies in recipient serum: No antibody binds
Negative Crossmatch (no cell lysis)
C
Donor-specific HLA antibodies in recipient serum: Antibody binds Complement activated
Positive Crossmatch (>20% of cells lysed)

Crossmatch contra donante: CDC

La lectura del test se hace al microscopio determinando el % de células muertas relativo al de células vivas. Para hacer un análisis semi-cuantitativo existe un score:

- **Score 0**: no hay células muertas.
- **Score 2**: representa un 20% de células muertas y es generalmente el cut-off para considerar una reacción positiva.
- **Score 4, 6**: incremento progresivo de células muertas.
- **Score 8**: representa 100% de células muertas.

Crossmatch contra donante: CDC

	Linfocitos T	Linfocitos B	Interpretación
Resultado	(+) Pos	(+) Pos	Anticuerpos anti Clase I o Anticuerpos anti Clase I y II
Resultado	(-) Neg	(+) Pos	Anticuerpos anti Clase II ó Anticuerpos anti Clase I en baja cantidad
Resultado	(-) Neg	(-) Neg	No hay anticuerpos o no pueden detectarse con esta técnica.

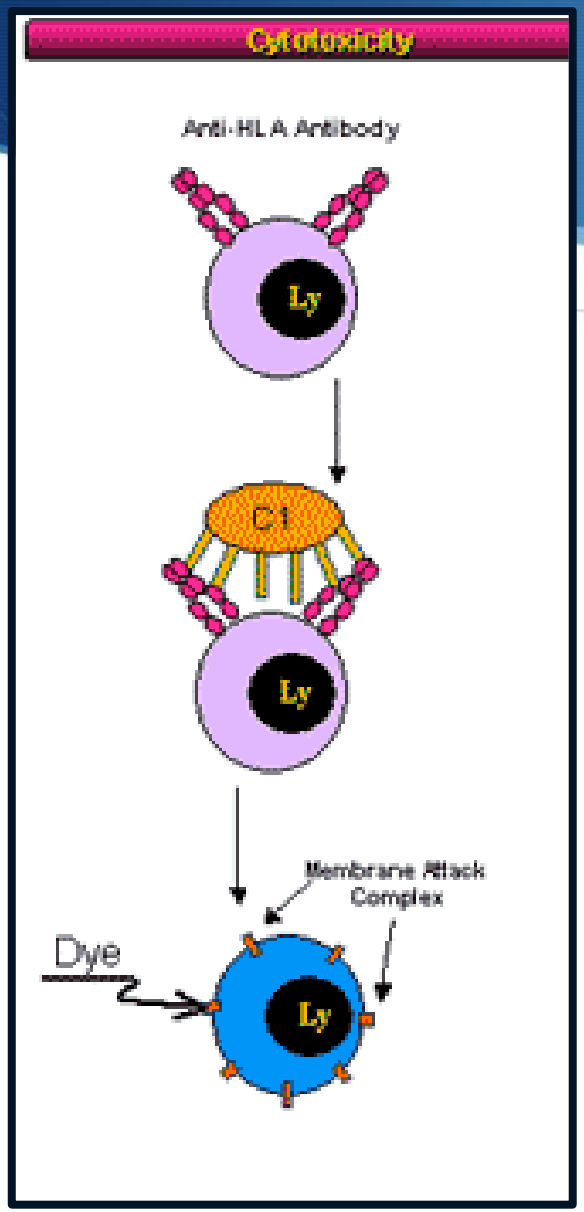
Un crossmatch positivo para Linfocitos T representa una contraindicación absoluta para el trasplante.

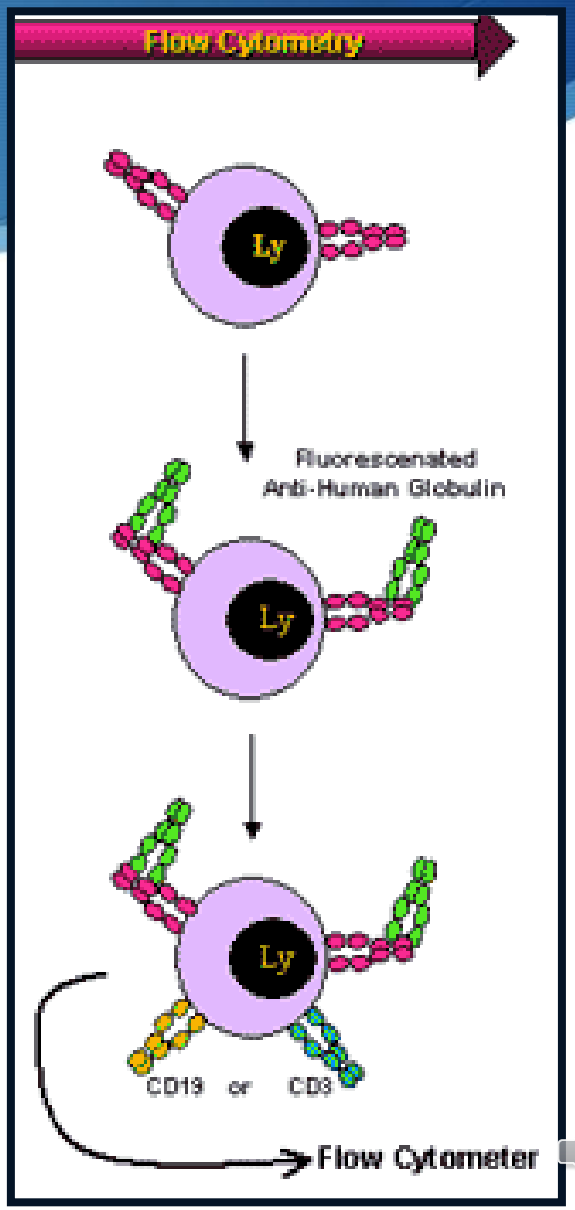
Crossmatch contra donante: CDC

EN QUE CASOS PUEDE SER NEGATIVO POR CDC CUANDO HAY PRESENCIA DE ANTICUERPOS ?

- Título muy bajo de anticuerpos para poder causar la activación de complemento.
- El anticuerpo presente no activa complemento.
- El anticuerpo presente en el suero tiene como target un antígeno que se expresa en bajos niveles en los linfocitos.

Evolución de la detección de Acs anti-HLA





CF: fundamento

- El XM por CF es una técnica de fluorescencia indirecta, independiente de Complemento, de alta sensibilidad.

- Detecta bajas concentraciones de Acs, que pueden causar **rechazo acelerado** en pacientes con Acs anti-HLA preformados **(DSA)**

Objetivo

- Consiste en evaluar la presencia de Acs anti-HLA específicos de donante en el suero del paciente (Receptor)

INCLUYENDO LOS ACS DE BAJO TITULO

- Indicar necesidades farmacológicas distintas, según su fuerza

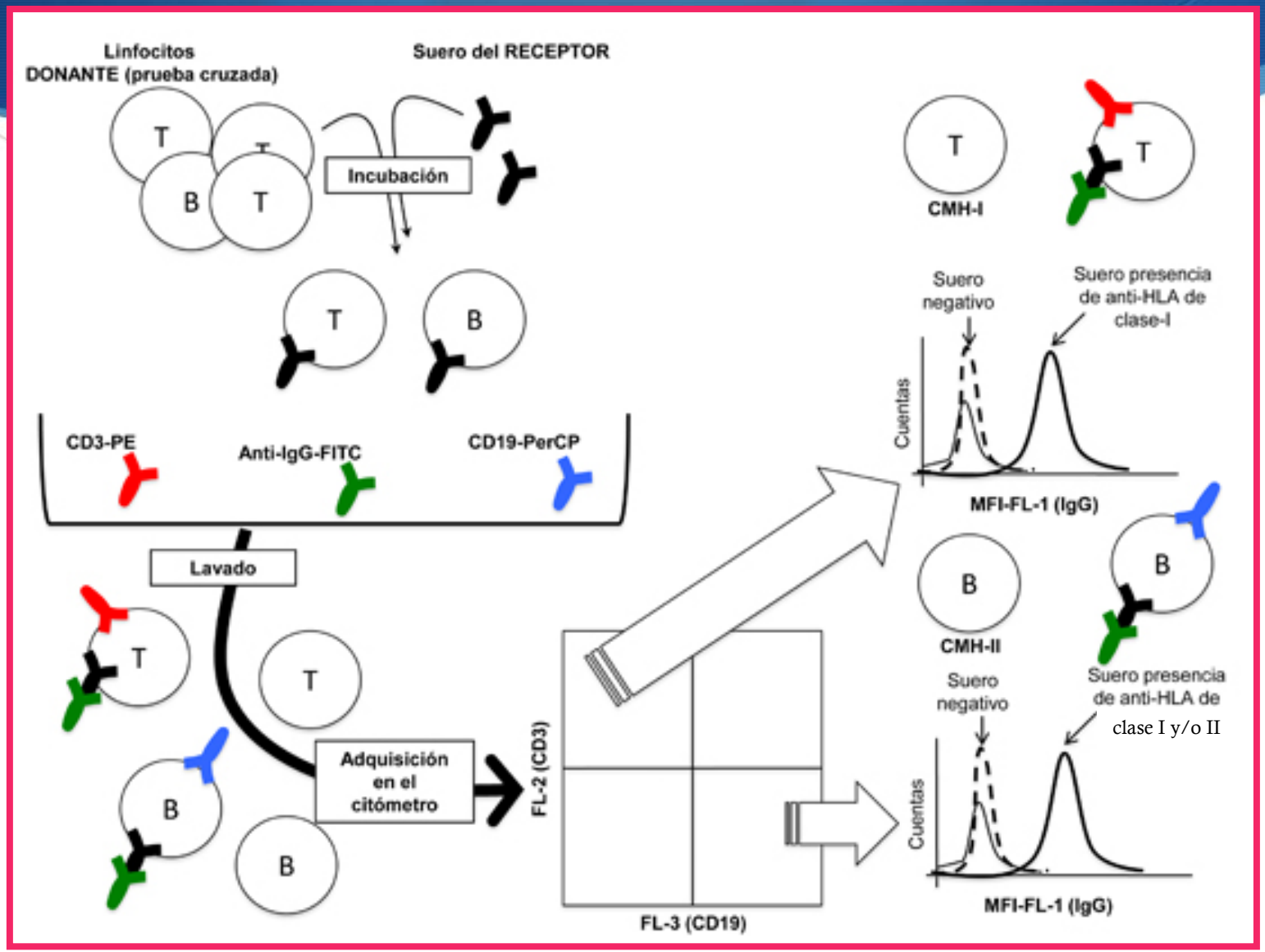
Ventajas del XM por CF

- **Sensibilidad**, 5-10x sobre XM-CDC
- Se analiza mayor número de linfocitos con mayor pureza.
- Pueden cuantificarse los Acs que producen positividad (ratio-MESF)
- Detecta Acs fijadores, y **no fijadores de complemento**
- Detecta **bajos niveles de Acs**
- Utilidad en receptores con riesgo inmunológico

Qué pacientes tienen indicación de XM por CF?

- **PACIENTES HIPERSENSIBILIZADOS (CON PRA > 70%)**
- **PACIENTES RETRASPLANTADOS**
- **PACIENTES QUE HAYAN SIDO TRANSFUNDIDOS EN LOS ULTIMOS 15 DIAS ANTERIORES A LA PRUEBA DE XM**

Técnica


Linfocitos
DONANTE (prueba cruzada)
Suero del RECEPTOR
T
B
T
Incubación
T
B
CD3-PE
Anti-IgG-FITC
CD19-PerCP
Lavado
T
T
B
B
Adquisición en el citómetro
FL-2 (CD3)
FL-3 (CD19)
T
CMH-I
T
Suero negativo
Suero presencia de anti-HLA de clase-I
Cuentas
MFI-FL-1 (IgG)
B
CMH-II
B
Suero negativo
Suero presencia de anti-HLA de clase I y/o II
Cuentas
MFI-FL-1 (IgG)

Técnica

Separación de Linfocitos por Gradiente de Ficoll-Hypaque

↓

Tratamiento con Pronasa*

↓

Incubación Suero+Células(30' a 4°C)

↓

Lavados PBS (s/Ca++, Mg++)

↓

IgG-FITC 10' a 4°C

↓

CD3-PE, CD19-TC (20' a 4°C)

↓

Lavados PBS

↓

Lectura Citómetro

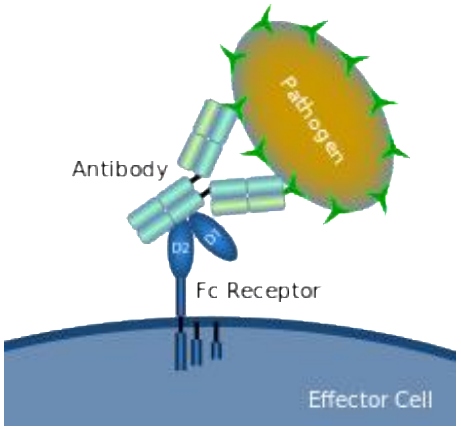
Los resultados se expresan en MCS que es la diferencia entre la mediana de fluorescencia del paciente y la mediana de fluorescencia del control negativo

Tratamiento con Pronasa

Linfocitos de Donante: Tratamiento con Pronasa

El XM por CF puede incluir (a diferencia del XM x CDC) un tratamiento previo a las celulas del donante

Este tratamiento esta dirigido a corregir la problemática del interpretación de los resultados positivos en linfocitos B



-Receptores Fc, se encuentran en mayor cantidad en Linfocitos B.

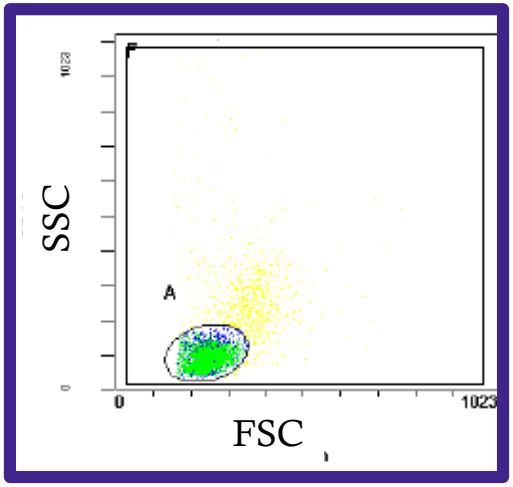
-Puede unir IgG en forma de agregados o en forma de complejos inmunes. (“IgG irrelevantes”)

-Produciendo XMCF con resultados falsos positivos.

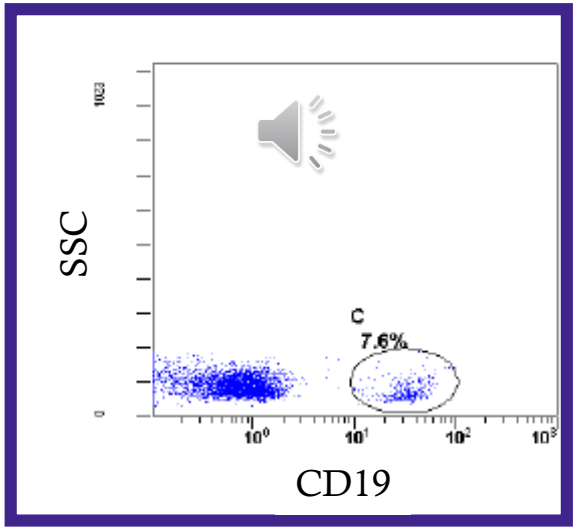
Técnica: Anticuerpos

- Se usa generalmente **anti IgG** en **FITC**. Es un anticuerpo policlonal.
- Para marcar **linfocitos T** se usa un anticuerpo monoclonal anti **CD3** mientas que para marcar linfocitos B se usan tanto un anticuerpo monoclonal **anti CD19** o **anti CD20** conjugados con PE, PerCP o APC.
- Puede hacerse la citometría en 3 ó 4 colores. En este último caso se puede agregar anti CD45 para seleccionar mejor las poblaciones.
- Todos estos anticuerpos deben ser **titulados** para ser usados en un volúmenes óptimos.

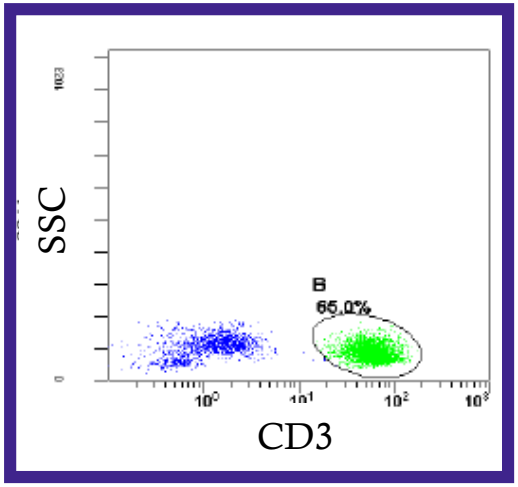
Análisis de las muestras



LINFOCITOS TOTALES

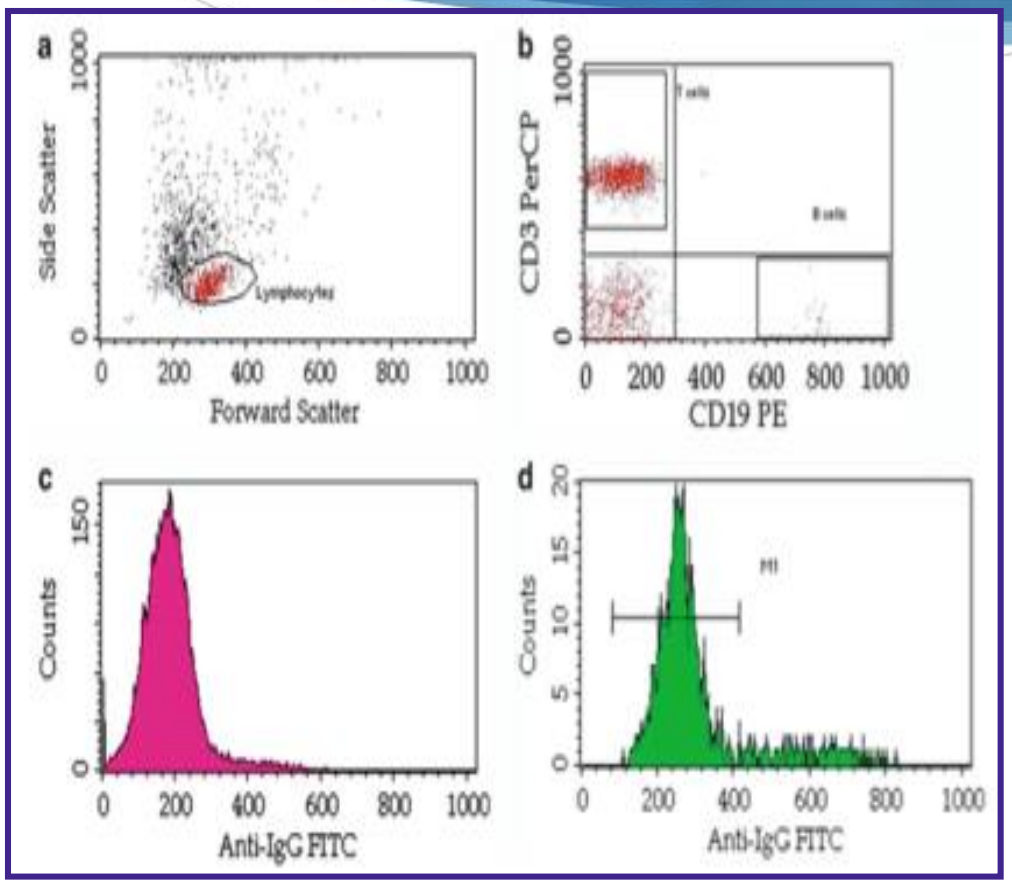


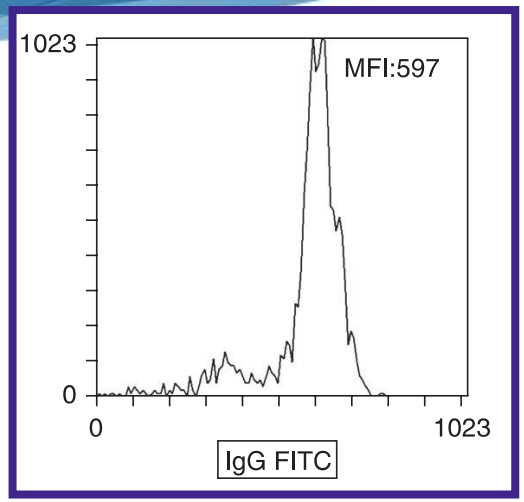
LINFOCITOS B CD19+

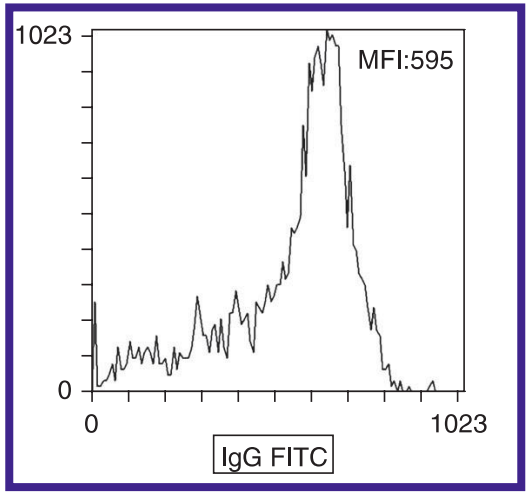


LINFOCITOS T CD3+

Análisis de las muestras e interpretación de resultados







Current Protocols in Cytometry

Interferencias

Drogas Inmunosupresoras	Resultado Falso Positivo/Negativo	Modificación FCXM
Tymoglobulina	LT	Absorción Conjugado
Rituximab	LB	Aumento Concentración Pronasa
IgIV	LT/LB	Aumento Lavados post incubación

Anticuerpos NO HLA	Resultado Falso Positivo	Modificación FCXM
Autoanticuerpos (IgG)	LT/LB	Auto XM
Agregados de IgG	LB	Inactivación suero 56ºC

Importancia de trabajar con CF y Fase sólida

Table 3
Immunologic relevance of positive crossmatches

Positive crossmatch	Cause	Detected by	Immunologically relevant?
T- and B-cell	IgG class I HLA antibody	Solid phase testing positive for class I antibody	Yes
B-cell	Low-titer class I HLA antibody	Solid phase testing positive for class I antibody	Yes
B-cell	IgG class II HLA antibody	Solid phase testing positive for class II antibody	Yes
T and B-cell or B-cell	IgG class I and class II HLA antibody	Solid phase testing positive for both class I and class II antibody	Yes
T and/ or B-cell	Autoantibody	Autocrossmatch positive	No
T and/ or B-cell	IgG non-HLA antibody	Solid phase testing negative	No
T and/ or B-cell	IgM non-HLA antibody	Negative after DTT treatment of serum	No
T and/ or B-cell	IgM class I or class II HLA antibody	Negative after DTT treatment of serum	Unknown—general practice tends to disregard as evidence is poor
T- and B-cell	Thymoglobulin/ Alemtuzumab	Clinical history	No
B-cell	Rituximab	Clinical history	No

K. Tinckam / Transplantation Reviews 23 (2009) 80–93

Seguimiento

- **Monitorear periódicamente** la producción de Acs anti–HLA tanto en pacientes sensibilizados o no, permite confeccionar la historia inmunológica de cada paciente.

Conclusión

- El proceso de trasplante es un acto médico complejo que involucra muchas especialidades en simultáneo.

- La evaluación del paciente no debe hacer foco solo en el órgano trasplantado sino en la **inmunología a nivel global**.

Bibliografía

- ASHI Laboratory Manual 4th Edition (2000) Vol II.
- The lymphocyte crossmatch by flow cytometry for kidney transplantation. Downing J. Methods in Molecular Biology. 2012;882:379-90
- Flow cytometric assessment of HLA alloantibodies. Bray RA, Gebel HM, Ellis TM. Current Protocols in Cytometry (2004) 6.16.1-6.16.24
- Understanding crossmatch testing in organ transplantation:A case-based guide for the general nephrologist.WILLIAM R MULLEY and JOHN KANELLIS.Nephrology 16 (2011) 125–133
- ASHI Lab Manual Title: Pronase Author: Stephanie Skibby, HLA Laboratory, Inland Northwest Blood Center, Spokane, WA.
- The crossmatch in renal transplantation. Evaluation of flow cytometry as a replacement for standard cytotoxicity. Scornik JC, Brunson ME, Schaub B, Howard RJ, Pfaff WW. (1994). Transplantation 57:621-625.
- Detection of Alloantibodies by Flow Cytometry: Relevance to Clinical Transplantation. Scornik JC. (1995). Cytometry. 22, 259-263.

MUCHAS GRACIAS!!

maemibianco@gmail.com